

PROSPECÇÃO DE RESISTÊNCIA AO GLIFOSATO EM POPULAÇÕES DE *CONYZA CANADENSIS*

GLYPHOSATE RESISTANCE SURVEY ON *CONYZA CANADENSIS*

Simão Mendes¹, João Portugal¹ e Isabel Calha²

RESUMO

O glifosato é o herbicida mais importante a nível nacional, utilizado principalmente para controlar infestantes em culturas perenes e em zonas não cultivadas. É considerado um herbicida de elevado risco de resistência. Em Portugal foi recentemente confirmada a resistência em *Conyza bonariensis*, em olival intensivo. Neste trabalho apresentam-se os resultados da prospecção realizada para deteção de resistência ao glifosato em populações de *Conyza canadensis*. Para confirmação da resistência, realizaram-se ensaios de dose-resposta com planta inteira. Obtiveram-se valores de ED₅₀ entre 32,72 g.ha⁻¹ na população susceptível e 77,91 g.ha⁻¹ na população mais resistente, permitindo obter níveis de resistência (NR=ED₅₀R/ED₅₀S) ao glifosato de 2 para todas as populações. Os valores de NR superiores à unidade parecem traduzir a tendência de todas as populações apresentarem resistência ao glifosato. Estes resultados serão confirmados em ensaios de laboratório para determinação do mecanismo de resistência.

Palavras - chave: Ensaio de dose-resposta, olival.

ABSTRACT

In Portugal, glyphosate is widely used for weed control on perennial crops and non-cropping areas. It is considered an herbicide of high risk of resistance worldwide. Glyphosate resistance in Portugal was recently confirmed in *Conyza bonariensis* populations from intensive olive groves. This paper presents the results of a survey conducted for detecting glyphosate resistance in populations of *Conyza canadensis*. Whole plant dose-response bioassays were conducted to confirm resistance. ED₅₀ values ranged from 32.72 g.ha⁻¹ in susceptible population to 77.91 g.ha⁻¹ for the most resistant population. The resistance factor (RF = ED₅₀R/ED₅₀S) was around 2 for all populations. These values reflect a trend that all populations studied were resistant to glyphosate and laboratory tests to determine the mechanism of resistance are in course.

Keywords: Dose-response bioassays, olive grove.

INTRODUÇÃO

O cultivo intensivo do olival, com recurso à rega e maior densidade de plantação, conduz a maior pressão dos organismos fitopatogénicos sobre a cultura e a maiores exigências da cultura no que respeita à sua nutrição. Tem-se verificado, por um lado, o incremento de pragas e doenças nos olivais regados, o que conduz a uma aplicação crescente de produtos fitofarmacêuticos (insecticidas e fungicidas) e no que respeita ao controlo das infestantes,

¹ Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária de Beja
jportugal@ipbeja.pt e simoonmendes@gmail.com

² Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P.
Laboratório Nacional de Investigação Agrária (INIA) Unidade de Investigação de Protecção de Plantas Quinta do Marquês
2784-505 Oeiras
isabel.calha@inrb.pt

a progressiva substituição de herbicidas persistentes por herbicidas não selectivos, não residuais, e, por isso, considerados com risco mais aceitável para o ambiente, de que é exemplo o glifosato. No entanto, a sua aplicação repetida não está isenta de riscos. E, se, por um lado, provoca menores riscos de contaminação do solo e água do que outros herbicidas, acarreta riscos para a diversidade biológica ao seleccionar populações de plantas infestantes resistentes, que o herbicida já não controla. A nível mundial conhecem-se 21 espécies com resistência ao glifosato, correspondentes a mais de 99 populações diferentes (Powles, 2008; Heap, 2011). Este fenómeno relativamente recente, tem já exemplos na Península Ibérica em olivais da Andaluzia, onde a repetida aplicação de glifosato seleccionou resistência em *Conyza* spp. e em *Lolium* spp. (Urbano *et al.*, 2005 e 2007; Martinez e Urbano, 2007; Cruz-Hipólito *et al.*, 2007). Em Portugal, a ocorrência de populações de *Conyza bonariensis* resistentes ao glifosato foi confirmada, em 2010 e trata-se do primeiro caso de resistência a este herbicida no país (Calha e Osuna, 2010).

O glifosato pertence à família química dos aminoácidos, sendo um herbicida não selectivo de aplicação foliar, com elevada sistemica na planta. Depois de aplicado é absorvido pelas folhas e rapidamente translocado para os ápices vegetativos (meristemas) onde vai exercer a acção herbicida. Tem um modo de acção único, actuando na biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, inibindo a actividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase (Steinrücken e Amrhein, 1980). O glifosato é o herbicida mais vendido, a nível mundial e nacional (Abreu, 2011) e está recomendado para controlar infestantes anuais e vivazes em culturas perenes durante o ciclo vegetativo e antes da instalação ou plantação, em culturas anuais. No mercado nacional, encontra-se formulado em herbicidas simples e mistos. A sua eficácia depende da dose e condições de aplicação, nomeadamente do estado de desenvolvimento das infestantes, na altura da aplicação.

O glifosato é um herbicida não selectivo que controla eficazmente largo espectro de infestantes anuais e perenes, incluindo as diferentes espécies de *Conyza*. Em Portugal, estão identificadas 3 espécies: *Conyza canadensis* (L.), Cronq. (avoadinha), *C. sumatrensis* (Retznis) Walker (ex *Conyza alba* Sprengel, (avoadinha-marfim) e *C. bonariensis* (L.) Cronq. (avoadinha-peluda). Também é referida a eventual presença de híbridos: *C. x rouyana* Sennen (*C. albida* x *canadensis*) e *C. x mixta* Fouc. e Neyr. (*C. bonariensis* x *canadensis*) (Franco, 1984).

Conyza canadensis é uma espécie originária da América do Norte, considerada invasora, mas naturalizada em Portugal. Encontra-se distribuída por todo o país, afectando numerosas culturas anuais e perenes e zonas não cultivadas. É uma planta anual diplóide ($2n=18$) heterogâmica da família botânica Asteraceae. A espécie produz elevado número de sementes (2000 a 230.000 por planta) de reduzida persistência (longevidade de 2-3 anos), pelo que não constitui um banco de sementes persistente no solo (Weaver, 2001). É uma espécie de Primavera-Verão, podendo ser anual ou bienal, consoante as espécies. A luz é essencial para a germinação das sementes de *Conyza*. De facto, não germinam sementes enterradas entre 2-6 cm de profundidade. Germina na Primavera e passa o Inverno sob a forma de roseta, só produzindo flores e fruto no 2º ano. O fruto é uma cipsela, cuja configuração permite a fácil dispersão a longas distâncias.

Neste trabalho apresentam-se os resultados da prospecção, realizada em olivais do distrito de Beja, para despistagem de resistência ao glifosato em populações de *Conyza canadensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie *Conyza canadensis*

A identificação das espécies de *Conyza* spp. presentes nos olivais suspeitos de resistência foi realizada com exemplares de

planta inteira, colhidos no campo (Franco, 1984). A amostragem de sementes de plantas de *Conyza canadensis* decorreu nos meses de Agosto e Setembro de 2010 (Quadro 1) em 7 olivais do distrito de Beja, onde se registaram queixas de falta de eficácia do glifosato quando aplicado na dose recomendada. A população susceptível (S) proveniente de um olival não tratado da mesma região foi utilizada como padrão.

Ensaio de germinação

Procedeu-se à determinação da capacidade germinativa das sementes de cada população. As sementes foram colocadas a germinar em placa de Petri de PVC, de diâmetro 10 cm, contendo agar (KNO_3 0,2%). Os ensaios de germinação decorreram em câmara de incubação Cassel CBT em condições de alternância de temperatura e luz: 20/25°C (\pm 1°C) e 12 h fotoperíodo (Karlssen e Milberg, 2007) e tiveram a duração de 15 dias. Cada população correspondia a 50 sementes por placa e 4 repetições.

Características toxicológicas e ecotoxicológicas do glifosato

O glifosato, pelo seu modo de acção, não é tóxico para mamíferos (não apresenta toxicidade aguda, não é cancerígeno, mutagénico

nem tóxico para a reprodução). Está classificado como irritante. Apresenta baixo risco de lixiviação; porque apesar da elevada solubilidade em água (11 600 mg L⁻¹) é pouco móvel no solo (Koc 884 a 60 000). A contaminação de águas subterrâneas é pouco provável, por ser rapidamente degradado por via microbiológica (DT_{50} =38-60 d) em AMPA (ácido aminooetilfosfónico) e por se manter fortemente ligado ao complexo argilo-húmico do solo. O risco de contaminação das águas superficiais é baixo, mas pode causar efeitos a longo prazo no meio aquático: sendo moderadamente tóxico para peixes e invertebrados aquáticos; não apresenta toxicidade para outros organismos não visados, designadamente abelhas, algas, e minhocas. (Dill *et al.*, 2010; CE, 2011).

Ensaio de dose-resposta

Para a confirmação de resistência ao glifosato adoptou-se o procedimento recomendado por HRAC (1999) e Heap (2005). As sementes foram colocadas à superfície de substrato saturado e o tabuleiro envolvido em papel de jornal para manutenção da humidade e luz (Lazarotto *et al.*, 2008). Plântulas com uma folha verdadeira (BBCH 11) foram transplantadas para vasos de PVC de 7 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade (2-4 plântulas por vaso), com substrato de

Quadro 1 - Identificação das amostras de sementes

Amostra	Local	Data de colheita	Espécie
S	Ferreira do Alentejo	01-08-10	<i>C. canadensis</i>
B1	Ferreira do Alentejo	01-08-10	<i>C. canadensis</i>
B2	Ferreira do Alentejo	04-08-10	<i>C. canadensis</i>
B3	Ferreira do Alentejo	01-08-10	<i>C. canadensis</i>
B4	Ferreira do Alentejo	06-09-10	<i>C. canadensis</i>
B5	Beja – S. Matias	06-09-10	<i>C. canadensis</i>
B6	Serpa	06-09-10	<i>C. canadensis</i>
B7	Figueira Cavaleiros/St. ^a Margarida Sado	01-8-10	<i>C. canadensis</i>

terra:turfa:areia (2:1:1) (18,9% areia, 58,8% limo, 22,3% argila, pH 7.4 e m.o. 2.2%), adubado com BLAUKORC (20 g v/v). A rega foi efectuada por subirrigação, quando necessária. Considerando que a susceptibilidade das plantas de *Conyza* spp. ao herbicida glifosato, depende da temperatura (Urbano *et al.*, 2007; Kleinman *et al.*, 2011), o ensaio decorreu em câmara climatizada (Fito-clima 1500 I – AraLab), com alternância de temperatura e luz 25/20°C, 12 h de luz -550 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Dinelli *et al.*, 2006).

Procedeu-se à aplicação de glifosato (RoundUp, 360 g s.a.L⁻¹, SL, Monsanto) numa gama de 6 doses de glifosato, incluindo a testemunha, na escala logarítmica (0, 45, 90, 180, 720, e 1440 g ha⁻¹) (Dinelli *et al.*, 2008). O herbicida foi aplicado com um OPS (*Oxford Precision System*) calibrado para aplicar 200 L ha⁻¹ herbicida (275 kPa) As plantas de *C. canadensis* tinham 2-4 folhas (BBCH 12-14).

O peso verde e a percentagem de sobrevivência foram determinados 21 dias após a aplicação (DAA). As plantas com o meristema apical necrótico eram consideradas mortas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. O ensaio foi repetido e os resultados foram combinados.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e transformados (arcsin) para obedecerem aos pressupostos da normalidade. Ajustou-se um modelo de regressão não-linear (Seefeldt *et al.*, 1995; Knezevic *et al.*, 2007) às curvas de dose-resposta que permitiram estimar o valor de ED₅₀ para cada população. O modelo do tipo logístico com 4 parâmetros tinha a seguinte expressão:

$$y=f(x)=\frac{c+\frac{d-c}{(1+(x/ED_{50})^b)}}{\quad} \quad (1)$$

em que y corresponde ao peso verde das plantas de *C. canadensis* (g) e x à dose de herbicida (g ha⁻¹). Uma das vantagens da curva descrita pela expressão (1) é que os parâmetros utilizados no modelo têm um sig-

nificado biológico. Assim, d, corresponde à assíntota superior da curva de dose-resposta, i.e., ao peso verde (g) obtido na dose mais reduzida de herbicida; c, à assíntota inferior da curva de dose-resposta, i.e., ao peso verde (g) obtido na dose mais elevada de herbicida; b, ao declive da curva de dose-resposta obtido ao nível do valor de ED₅₀ (dose que provoca a redução de 50% do peso verde relativamente à testemunha).

RESULTADOS

Ensaio de germinação

A espécie *Conyza canadensis* não apresentou período de latência e a germinação foi rápida, atingindo a capacidade germinativa (CG) ao fim de 17 dias. A capacidade germinativa das populações de *C. canadensis* variou entre 42% e 84,5%. As populações B1 e B5 tiveram de ser descartadas nos primeiros ensaios pela baixa CG. Procedeu-se a nova colheita de amostras para tentar obter sementes com grau de maturação mais elevado. Segundo a bibliografia esta espécie não apresenta dormência, tendo apenas a luz como factor limitante da germinação (Baskins e Baskins, 1998).

Ensaio de dose resposta

Os ensaios decorreram de Novembro de 2010 a Janeiro de 2011. Verificou-se o aumento da mortalidade das plantas com o aumento da dose na população susceptível. Na dose de 180 g ha⁻¹, registou-se a taxa de mortalidade de 25%, seguida de 50% para as doses de 360 e 720 g ha⁻¹ e 100% nas doses mais elevadas. Pelo contrário, nas outras populações, registaram-se taxas de mortalidade entre 25% e 50% apenas na dose mais elevada, para as populações B2, B4 e B6.

A resposta das populações de *C canadensis*, a doses crescentes de glifosato, expressa em peso verde, foi diferente entre as populações, seguindo uma curva logística (Figura 1). Os valores de ED₅₀ obtidos variaram en-

Quadro 2 – Parâmetros do modelo log-logístico ajustado às curvas de dose-resposta ao glifosato, em quatro populações de *Conyza canadensis*.

População	b		C		d		ED ₅₀ (e)		NR
		SE	(g)	SE	(g)	SE	(g. ha ⁻¹)	SE	
S	1.39	(1.232)	0.04	(0.041)	1.00	(0.045)	32.72	(29.628)	1
B2	2.37	(1.236)	0.07	(0.028)	1.00	(0.045)	65.43	(13.35)	2,00
B4	2.29	(0.705)	0.03	(0.027)	1.00	(0.045)	77.91	(8.636)	2,38
B6	3.95	(3.074)	0.02	(0.023)	0.99	(0.045)	69.97	(14.176)	2,14

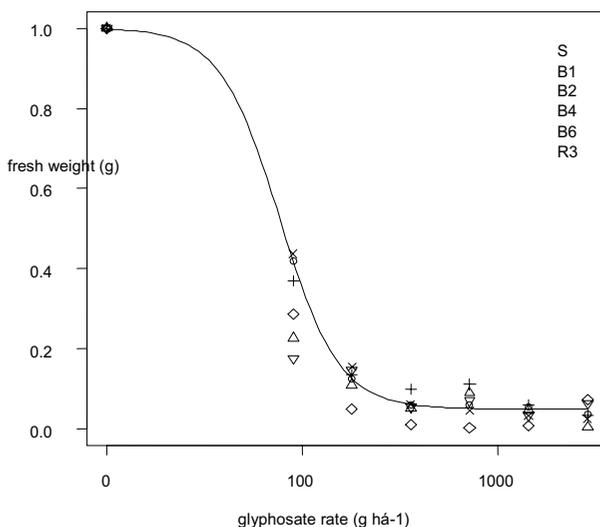


Figura 1 - Curvas de dose-resposta ao glifosato para 4 populações de *Conyza canadensis*.

tre 32,72 g ha⁻¹ na população susceptível (S) e 77,91 g ha⁻¹ na população mais resistente (B4) permitindo obter níveis de resistência (NR) ao glifosato de 2 para todas as populações; o que significa que, na prática será necessário aplicar o dobro da dose de glifosato para controlar as populações resistentes (Quadro 2).

Os valores de NR superiores à unidade parecem traduzir a tendência de todas as populações estudadas apresentarem resistência ao glifosato. Estes resultados poderão ser confirmados nos ensaios de laboratório a realizar posteriormente, para determinação do mecanismo responsável pela resistência.

Os NR ao glifosato são relativamente baixos em *Conyza* spp., não atingindo valores superiores a 2 para *C. bonariensis* e entre 7 e 10 para *C. canadensis* (Leon *et al.*, 2005; Kleinman *et al.*, 2011). Estes valores dependem do mecanismo bioquímico responsável pela resistência. O mecanismo mais frequente em dicotiledóneas é a perda de sistemica do glifosato nos biótipos resistentes (Dinelli *et al.*, 2006 e 2008). Recentemente foi identificado um biótipo de *C. sumatrensis* R ao glifosato com NR de 60. Este valor excepcional está associado à ploidia e à mutação no gene que codifica a enzima alvo do glifosato EPSP sintase (Gonzalez-Torralva *et al.*, 2011).

CONCLUSÃO

Confirmação de resistência ao glifosato em 3 populações de avoadinha (*Conyza canadensis*), infestante de olivais intensivos do Baixo Alentejo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, J.V. (2011) – *Vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2010*. Lisboa, DGADR, 21 pp.
- Baskins, C.C. e Baskins, J.M. (1998) – *Seeds – Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego, Academic Press, 606 pp.
- Calha, I.M. e Osuna, M.D. (2010) – Herbicide Weed Resistance in Portuguese Olive Groves. *AFPP – 21st COLUMA Conference – International Meeting On Weed Control*, Dijon – 8 e 9 Dezembro.
- European Commission (2011) - EU Pesticides Database. - Regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L 70/1, 16.3.2005. Disponível em < http://www.ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm >.
- Cruz-Hipolito, H.E., Diaz, M.A., Ruiz-Santaella, J.P., De Prado, R.A., Menendez, J. e Vidal, R. (2007) – Glyphosate resistance in several populations of *Lolium* spp. from Spain. In: *Proceedings 2007 WSSA Annual Meeting*. Santo António, Texas.
- Dill MD, Sammons RD, Feng PCC, Kohn F, Kretzmer K, Mehrsheikh A, Bleeke M, Honegger JL, Farmer D, Wright D. e Haufear EA (2010)- Glyphosate: discovery, development, applications and proprieties. In: Naudula V.K. (Ed.) - *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds – History Development and Management*. Hoboken, NJ, USA, Wiley, 321 pp.;
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti A., Minelli M., Catizone P. e Barnes J. (2006) - Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 30–41.
- Dinelli G., Marotti I., Catizone P., Bonetti A., Urbano J.M. e Barnes J. (2008) - Physiological and molecular basis of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain, *Weed Research*, 48: 257– 265.
- Franco, J.A. (1984) – *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Clethraceae - Compositae*. Lisboa, Edição de Autor, Volume II, 660 p.
- González-Torrvalva, F., Gil-Humanes, J., Rojano-Delgado, A.M., Cruz-Hipolito, H.E., Barro, F. e De Prado, R. (2011) – New target site mutation in a glyphosate resistant sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*). In: *Proceedings 2011 WSSA Annual Meeting, Portland, OR*, 137.
- Heap I.M. (2005) – *Criteria for confirmation of herbicide-resistant weeds – with specific emphasis on confirming low level resistance*. (Acesso em Julho 2011) - Disponível em < [http:// www.weedscience.org](http://www.weedscience.org) >.
- Heap I.M. (2011) – *International survey of herbicide-resistant weeds*. (Acesso em Julho 2011). Disponível em < [http:// www.weedscience.org](http://www.weedscience.org) >.
- HRAC (1999) – Detecting herbicide resistance- guidelines for conducting diagnostic tests and interpreting results. *Leaflet*. Herbicide Resistance Action Committee, HRAC. 8 p.
- Karlsson, L.M. e Milberg, P. (2007) – Comparing after-ripening response and germination requirements of *Conyza canadensis* and *C. bonariensis* (Asteraceae) through logistic functions. *Weed Research*, 47: 433-441.
- Kleinman, Z., Matzrafi, M., Sibony, M. e Rubin, B. (2011) – Glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* and *Lolium rigidum* in Israel. *Proceedings 2011 WSSA Annual Meeting, Portland, OR*.
- Knezevic, S.Z., Streibig, J.C. e Ritz, C. (2007) – Utilizing R software package for dose-response studies: the concept

- and data analysis. *Weed Technology*, 21: 840-848.
- Lazaroto, C.A., N.G. Fleck e Ribas, A.V. (2008) – Biología e ecofisiología de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). *Ciência Rural*, Santa Maria, 38: 852-860.
- Leon, J.M., Barnes, J. e Urbano, J.M. (2005) – Influencia del estado fenológico de *Conyza bonariensis* en la respuesta a la aplicación de glifosato, *In: Menendez et al.* (Eds) - *Malherbologia Iberica y Magrebi: Soluciones Comunes a Problemas Comunes*. Huelva, Junta de Andalucía, Univ. Huelva, p. 575-582.
- Martinez, A. e Urbano, J.M. (2007) – Nivel de resistencia a glifosato en poblaciones de *Conyza canadensis* de Andalucía. *In: Actas del XI Congreso de la Sociedad Española de Malherbologia*, pp. 349-353.
- Powles, S.B. (2008) – Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Management Science*, 64: 360-365.
- Seefeldt, S.S., Jensen, J.E. e Fuerst, E.P. (1995) – Log-logistic analysis of dose-response relationships. *Weed Technology*, 9: 218-227.
- Steinrucken, H. e Amrhein, N. (1980) – The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemistry Biophysical Research Communication*, 94: 1207-1212.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Gimenez, C., Leon, G.M.Y. e Barnes, J. (2005) – Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Sci. Soc. America Abstracts*, 118.
- Urbano, J.M., Borrego, A., Torres, V., Gimenez, C., Leon, G.M.Y., Jimenez, C., Dinelli, G. e Barnes, J. (2007) – Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed Technology*, 21: 396-401.
- Weaver, S.E. (2001) – The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal Plant Science*, 81: 867-875.

AGRADECIMENTOS

A Leonor Cruz, Ana Neves e M^a Lurdes Silva do LINIA_INRB I.P. pela cedência de espaço no Fitoclima e a disponibilidade e dedicação na manutenção dos ensaios. Este estudo foi parcialmente financiado pelo projecto PRODER - REMDA Olival.